

Хроматомасс-спектрометрическая идентификация и определение глицирризина в экстрактах из корня солодки и пищевых продуктах

***А.Н. Ставрианиди, Е.А. Стекольников, И.А. Родин, О.А. Шпигун**

МГУ имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

**Адрес для переписки: Ставрианиди Андрей Николаевич, E-mail: stavrianidi.andrey@gmail.com*

Поступила в редакцию 25 июля 2017 г., после исправления – 25 августа 2017 г.

Современные способы идентификации компонентов биологически активных добавок и продуктов питания основаны, главным образом, на применении способа распознавания «отпечатков пальцев» разных видов растений путем определения присутствия и количественного соотношения отдельных соединений – биомаркеров этих растений. Такой подход оправдывает себя, поскольку часто группа близких по структуре соединений является уникальной для одного рода растений. Для селективного определения выбранных биомаркеров и их структурных аналогов необходимо применение высокоинформативных способов разделения и детектирования компонентов пробы, таких как ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС. В проведенном исследовании были предложены и сопоставлены разные варианты МС детектирования для определения сапонинов, характерных для разных видов растений, обладающих сладким привкусом и ароматом – женьшеня, абруса и солодки. Показано, что наиболее распространенный способ определения биомаркера корня солодки – глицирризина с использованием режима регистрации выбранных ионных переходов может обеспечить его селективное детектирование в сложных объектах, однако не полностью гарантирует отсутствие мешающего влияния близких по структуре компонентов других растений. Разработан способ получения профилей сапонинов по выбранным ионам паттернов фрагментации сапогенинов, обеспечивающий достаточную информативность анализа, и проведено его опробование на примере анализа пищевого продукта неустановленного состава – ароматизированного женьшеневого чая (улуна).

Ключевые слова: высокoeffективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия, сапонины, солодка, пищевые добавки.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2017, vol. 21, no. 3, pp. 230-240

DOI: 10.15826/analitika.2017.21.3.009

Liquid chromatography mass spectrometry identification and determination of glycyrrhizin in licorice root extracts and food products

***A.N. Stavrianidi, E.A. Stekolshchikova, I.A. Rodin, O.A. Shpigun**

Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1, Moscow, 119991, Russian Federation

**Corresponding author: Andrei N. Stavrianidi, E-mail: stavrianidi.andrey@gmail.com*

Submitted 25 July 2017, received in revised form 25 August 2017

Dietary supplements and food products quality control methods are mainly based on the chromatographic fingerprint as a feasible technique for species authentication and qualitative ratio determination of individual biomarkers. The application of this approach allows detecting a number of closely related compounds unique for a particular plant genus. Highly informative methods such as HPLC-MS and HPLC-MS/MS are used for the separation and selective determination of chosen biomarkers in the case of their poor absorbance at the non-selective wavelength. Present study demonstrates the advantages and disadvantages of the different types of MS detection for the determination of characteristic saponins of different plant species with a sweet taste and aroma - ginseng, abrus and licorice. It is shown that the multiple reaction monitoring for the licorice root biomarker – glycyrrhizin – can provide its selective determination in complex matrixes

of plant material, but the presence of other plant components might interfere with the analysis. As an alternative, a technique of selected ion monitoring of sapogenin fragmentation pattern ions was developed. The combination of retention time and the presence of several characteristic fragment ions provided more informative and reliable analysis of the related compounds. Unlike molecular ion detection technique, this approach can unambiguously distinguish compounds with different sapogenin but identical molecular mass in complex mixtures. Applicability of the developed technique was tested during the analysis of unidentified food product – ginseng oolong tea.

Keywords: high performance liquid chromatography/mass spectrometry, saponins, licorice, food supplements.

ВВЕДЕНИЕ

Корень солодки голой (*Glycyrrhiza glabra*) семейства бобовые (*Fabaceae*) используется во всем мире в качестве естественного подсластителя и, в некоторых случаях, в качестве ароматизатора для приготовления конфет и различных продуктов. Кроме того, порошкообразный корень солодки обычно применяют в качестве лекарственного средства, он входит в состав примерно 60% предписаний и рецептов в традиционной китайской медицине (ТКМ) [1]. Экстракт корня солодки обладает противоспазматическими, антидиабетическими, антидепрессивными, гепатопротекторными свойствами, отхаркивающим эффектом и активностью по увеличению памяти [2-5]. Основным компонентом корня солодки является глицирризин (глицирризиновая кислота; 20 β -карбок-си-11-оксо-30-норолеан-12-ен-3 β -ил-2-О- β -D-глюкопирануранозил- α -D-глюкопиранозидурановая кислота). Глицирризин наряду с другими тритерпеновыми сапонинами, например абрусозидами из листьев четочника молитвенного (*Abrus precatorius* L.) [6], отвечает за сладкий вкус и аромат, интенсивность которого в 170 раз выше относительно сахарозы [7]. Глицирризин обладает противовоспалительным, противовирусным, антиаллергенным эффектом, а также проявляет хемопротекторную активность против рака и СПИДа [8-10]. Наряду с глицирризином более 400 других тритерпеновых сапонинов и флавоноидов, отвечающих за терапевтический эффект, было обнаружено в *G. glabra* и родственных видах [11]. Некоторые сапонины корня солодки и их агликоны вызывают отрицательные побочные эффекты, включая нарушение выведения солей и гипокалиемическую артериальную гипертензию [12]. Так глицирретовая кислота, активный метаболит корня солодки, подобно альдостерону, ингибирует фермент – 11- β -гидроксистероиддегидрогеназу 2-го типа, что приводит к индуцированному кортизолом минералокортикоидному эффекту и тенденции к повышению уровня натрия и уменьшению содержания калия. Последствия продолжительного применения препаратов на основе корня солодки или употребления большого количества этого продукта в пищу могут быть заметны на протяжении значительного временного периода, из-за большого периода полувыведения глицирретовой кислоты и длительной нормализации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, которая может продолжаться до 6 меся-

цев [13]. Верхняя граница нормы суточного потребления глицирризина составляет около 100 мг, что приблизительно соответствует 60-70 г высушенного корня *G. glabra* [14].

Для извлечения компонентов из корня солодки применяли традиционные способы жидкостной экстракции, включающие непрерывную экстракцию при комнатной температуре или при нагревании, экстракцию в ультразвуковой ванне, кипячение в колбе с обратным холодильником и экстракцию в аппарате Сокслета. Для экстракции использовали различные растворители, включая метанол, этанол и их водные растворы с концентрацией органического компонента 50-95 % по объему [11]. Также применяли микроволновую экстракцию [15], экстракцию под давлением [16, 17] и сверхкритическую флюидную экстракцию с добавкой органического растворителя на уровне 10-15 % по объему [18], а также экстракцию водой в субкритическом состоянии [19].

Подробный обзор существующих методов анализа корня солодки и методов определения глицирризина и его аналогов представлен в работе [11]. Наиболее часто применяемым методом определения глицирризина на сегодняшний день является ВЭЖХ-МС/МС [20, 21]. Для количественной оценки содержания глицирризина и его аналогов измерения проводят в режиме регистрации выбранных ионных переходов, так было показано, что для всех обнаруженных сапонинов фрагментными ионами были депротонированные молекулы глюкуронозил-(1,2)-глюкуроновой кислоты ($m/z = 351$), глюкуроновой кислоты ($m/z = 193$) и ее производного с отщеплением молекулы H_2O ($m/z = 175$) [22, 23]. В некоторых работах для быстрого скрининга пищевых добавок и средств ТКМ применяют ВЭЖХ-МС/МС, используя времяпролетные масс-анализаторы [24] и орбитальную ионную ловушку [25].

Сапонины корня солодки обычно присутствуют в составе средств ТКМ в смеси с компонентами других растений [24]. Кроме того, сапониновые профили солодки значительно отличаются в зависимости от географического района, состояния зрелости растений, условий окружающей среды, сбора и переработки [20]. В этой связи, логичным представляется использование паттернов фрагментации [26, 27], характерных для масс-спектров сапонинов солодки, чтобы повысить информативность их хроматомасс-спектроскопического определения, поскольку изменения в составе растительного материала могут повлиять на его терапевтическую

активность, и как позитивный, так и негативный эффект могут оказывать близкие по структуре глицирризины компоненты солодки.

Таким образом, целью настоящего исследования стала проверка применимости ВЭЖХ-МС/МС способа определения глицирризина не только в экстрактах из растительного сырья, но и объектах сложного состава, на примере ароматизированного чайного напитка, а также разработка быстрого способа идентификации присутствия экстракта из корня солодки в составе лекарственных средств и пищевых продуктов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворы и реагенты. В работе использовали следующие реактивы: глицирризин (>98%, Phytolab, Германия), ацетонитрил, изопропанол и метанол (для градиентной хроматографии Merck, Германия), муравьиная кислота (Sigma Aldrich, Германия). Деионизированную воду получали из системы Milli-Q (Millipore, США).

Оборудование. В работе использовали систему ВЭЖХ-МС/МС, состоящую из tandemного масс-спектрометра QTrap 3200 (AB Sciex, Канада), оснащенного источником электрораспылительной ионизации, и системы ВЭЖХ ULTIMATE 3000 (Dionex, США). В качестве неподвижной фазы использовали колонку с обращено-фазовым сорбентом Acclaim RSLC, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2.1 мм, размером зерна сорбента 2.2 мкм (Thermo Scientific, США). Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью персонального компьютера и программного пакета «Analyst» (AB Sciex, Канада).

Приготовление стандартных растворов и построение градуировочных зависимостей. Навеску глицирризина массой 2 мг растворяли в

1 мл изопропанола. Полученный раствор использовали для приготовления серий градуировочных растворов с концентрациями 1, 3, 6, 20, 30, 60, 125, 250, 500, 750, 1000 и 2000 нг/мл. Полученные для водных растворов метрологические характеристики приведены в табл. 1.

Анализ растительных экстрактов. В работе использованы коммерчески доступные на территории РФ образцы женьшеневого улуна (ООО «Леаланис», ООО «Универсальные пищевые технологии», ООО «Орими трейд», ООО «101 чай»), корня солодки и корня женьшеня (ООО «Азбука трав», ООО «Русские корни», ООО «Беловодье»), а также листья *A. precatorius* (Herbalveda Ltd., Англия), корейский женьшеневый чай (Korea Ginseng Mfg Co., Ltd., Южная Корея) и женьшеневый улун (Huanglongtai tea co., ltd., КНР). Для приготовления экстрактов отбирали навески около 100 мг измельченных в ступке чайных гранул, корней солодки и женьшеня, а также листьев четочника молитвенного. Использовали по три навески каждого образца. К навескам добавляли 10 мл смеси изопропанол:вода (7 : 3) в пробирке объемом 15 мл, тщательно перемешивая. Далее проводили экстракцию в ультразвуковой ванне (ЗАО «ПКФ Сапфир», УЗВ-1.3 л, 190 Вт, 35 кГц) при 25-30 °С в течение 40 минут. Отбирали 5 мл надосадочной жидкости и пропускали через 0.45 мкм фильтр CHROMAFIL Xtra (Macherey-Nagel, Германия), отбрасывали первые 2-3 мл экстракта, и отбирали 1 мл полученного фильтрата в пробирку для центрифугирования (1.5 мл). Для проверки степени извлечения к осадкам пробы на бумажном фильтре прибавляли двумя порциями 2 мл экстрагента и высушивали на воздухе, затем переносили осадок в пробирку объемом 15 мл и повторяли процедуру экстракции. Далее отфильтрованные экстракты центрифугировали 10 минут при

Таблица 1

Условия детектирования и метрологические характеристики для определения глицирризина и построения профилей сапонинов

Table 1

Detection conditions and analytical characteristics for glycyrrhizin determination and saponin profiling

Способ детектирования	Регистрация выбранных ионных переходов	Регистрация выбранных ионов
Программа градиентного элюирования	0-2 мин – 10% Б* 2-11 мин – 10—95% Б 11-14 мин – 95% Б 14-18 мин – 10% Б	0-2 мин – 10 % Б 2-35 мин – 10-57 % Б 35-41 мин – 10-95 % Б 41-44 мин – 95 % Б 44-48 мин – 10 % Б
Объем вводимой пробы, мкл	10	20
Полярность детектирования	Отрицательная	Положительная
Регистрируемые сигналы	$m/z = 821 \rightarrow 351$, $m/z = 821 \rightarrow 193$	$m/z = 471, 453, 435$,
Предел обнаружения (нг/мл), диапазон линейности (нг/мл), коэффициент детерминации (r^2)**	2, 6-1000 0.9990	10, 30-1000 0.9989

Примечания: * – концентрация элюента Б – ацетонитрила в % по объему; ** – при определении глицирризина.

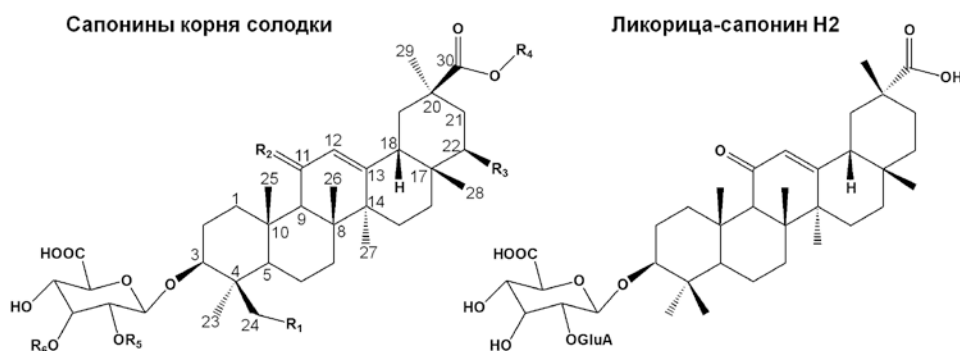
16 000 об/мин и отбирали 700 мкл надосадочной жидкости в стеклянные вials. Экстракты хранили не более 4 дней при 4 °С, затем разбавляли в 10 и 100 раз раствором подвижной фазы А в вials перед ВЭЖХ-МС анализом.

Условия хроматомасс-спектрометрического определения. Определение проводили в режиме отрицательной ионизации электрораспылением и последующей регистрации выбранных реакций. Температура источника ионизации составляла 350 °С, напряжение на капилляре 5.5 кВ; давление газа-завесы 1 бар; давление газа-распылителя 2.8 бар. Разделение пробы проводили в градиентном режиме подачи элюента, скорость потока составляла 0.4 мл/мин. Температура термостата колонки 35 °С. Подвижная фаза состояла из двух

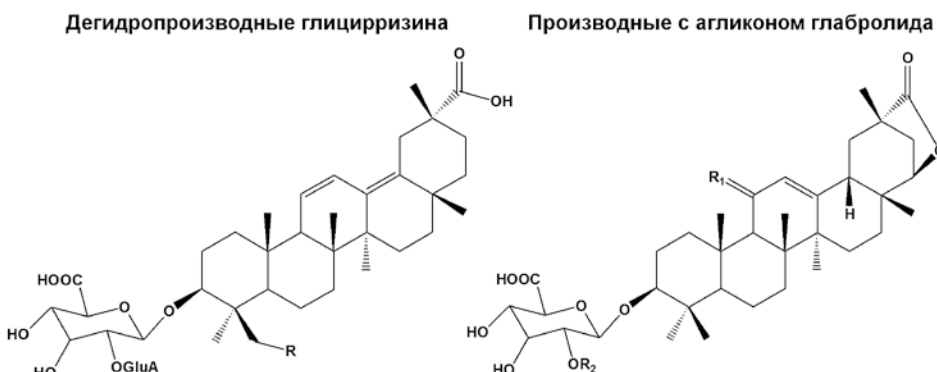
компонентов: воды с добавкой 0.1 % муравьиной кислоты — элюент А и ацетонитрила — элюент Б. Использовали две программы градиентного элюирования (табл. 1) для работы в режимах регистрации выбранных ионных переходов глицирризина и выбранных ионов для построения профилей сапонинов в исследованных экстрактах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение глицирризина методом ВЭЖХ-МС/МС. Помимо глицирризина (рис. 1), в корнях солодки содержится большое число других важных сапонинов близкой структуры, например, ликорица-сапонин G2, также в состав растения входят их сапогенины (агликоны) — глицирретовая кислота,



Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Глицирризин	H	O	H	H	GluA	H
Ликорица-сапонин A3	H	O	H	Glc	GluA	H
Ликорица-сапонин B2	H	O	H	H	GluA	H
Ликорица-сапонин D3	H	H ₂	OCOCH ₃	H	GluARha	H
Ликорица-сапонин G2	OH	O	H	H	GluA	H
Ликорица-сапонин J2	OH	H ₂	H	H	GluA	H
Ликорица-сапонин L3	OH	H ₂	OCOCH ₃	H	GluARha	H
22β-ацетоксиглицирризин	H	O	OCOCH ₃	H	GluA	H
Уралсапонин В	H	O	H	H	H	GluA
Апиоглицирризин	H	O	H	H	Api	H
Арабоглицирризин	H	O	H	H	Ara	H



Ликорица-сапонин C2 (R=H)	Ликорица-сапонин E2 (R ₁ =O, R ₂ =GluA)
Ликорица-сапонин K2 (R=OH)	Ликорица-сапонин F3 (R ₁ =H ₂ , R ₂ =GluARha)

Рис. 1. Сапонины корня солодки (*Glycyrrhiza*)

Fig. 1. Saponins from licorice roots (*Glycyrrhiza*)

глаголид и другие [11]. Таким образом, для оценки состава препарата или исходного растительного материала необходимо идентифицировать пики сапонинов на хроматограмме, а затем осуществить расчет содержаний хотя бы основных компонентов, стандарты которых имеются в коммерческом доступе. Обычно определяют глицирризин, поскольку его содержание в корнях солодки значительно больше, чем любого другого сапониона. Применение УФ детектирования для определения большинства сапонинов солодки является возможным, благодаря наличию кето-группы при одиннадцатом атоме углерода, в этом случае идентификацию пика глицирризина можно осуществить только по времени удерживания, так как запись хроматограмм осуществляют на недостаточно селективной длине волны поглощения – 250 нм [11]. Однако более информативным и универсальным является ВЭЖХ-МС анализ в режиме сканирования положительных ионов [20]. Использование молекулярных ионов, а также их аддуктов в режимах регистрации положительных и отрицательных ионов, совместно с временем удерживания хроматографического пика для идентификации глицирризина не обеспечивает селективного определения этого компонента в экстрактах, смешанных лекарственных средствах и пищевых добавках (особенно в варианте масс-спектрометрии высокого разрешения совместно с ультра-ВЭЖХ системами, где время удерживания перестает быть значимым параметром для идентификации), по причине того, что такую же брутто-формулу и близкие времена удерживания будут иметь другие сапонины, например, ликорица-сапонин K2 или абрусозиды D и E, последние, к тому же, являются компонентами другого представителя семейства бобовые – *Abrus precatorius*. Долгое время даже считалось, что сладкий вкус экстракта из листьев *A. precatorius* обусловлен содержанием в них глицирризина, что было опровергнуто в дальнейших исследованиях, где была показана сладость самих абрусозидов [28].

Применение tandemной масс-спектрометрии позволяет частично снять вопрос правильности идентификации за счет выбора специфических фрагментных ионов, поэтому первой задачей нашего исследования стало определение глицирризина в экстрактах из корня солодки и в женьшеневом чае (улуне), а также проверка мешающего влияния других сапонинов. Для этого было решено использовать указанные в работе [20] ионные переходы с $m/z = 823 \rightarrow 471$ и $823 \rightarrow 453$ в режиме регистрации положительных ионов, однако в полученном масс-спектре глицирризина присутствовали только интенсивные сигналы аддуктов с Na и K. При этом с хорошей чувствительностью удалось зарегистрировать ионные переходы с $m/z = 821 \rightarrow 351$ и $821 \rightarrow 193$ в режиме регистрации отрицательных ионов (табл. 1). Разделение осуществляли в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ по аналогии с методикой, описанной в работе [20], на колонке, заполненной сорбентом с привитыми группами C18, используя в качестве подвижной фазы ацетонитрил и воду с добавкой муравьиной кислоты.

Для проверки мешающего влияния других сапонинов в одинаковых условиях были дополнительно проанализированы экстракты из листьев *A. precatorius*, корня женьшеня *P. ginseng* и корейского женьшеневого чая (табл. 2). Содержание глицирризина в двух исследованных образцах корня солодки оказалось одинаковым и близким к 3 %, что сопоставимо с указанным в европейской фармакопее значением – 4 % [29], поскольку исследованные коммерчески доступные образцы корня солодки содержали больше корневых отростков, чем частей основного корня. Путем суммирования результатов двух последовательных экстракций в ультразвуковой ванне и расчета содержания определяемого компонента в первой порции экстракта было показано, что около 90 % глицирризина извлекается из растительного материала на первой стадии экстракции изопропанолом в воде (70 % по объему) в течение 40 минут. Степень извлечения глицирризина из чая может быть ниже вследствие

Таблица 2

Результаты определения глицирризина в корне солодки и женьшеневом чае (улуне)

Table 2

Results of glycyrrhizin determination in licorice roots and ginseng oolong

Образец	Содержание глицирризина, мг/г	
Женьшеневый улун (производитель № 1)	Менее 0.02	
Женьшеневый улун (производитель № 2)	0.37 ± 0.06	
Женьшеневый улун (производитель № 3)	0.69 ± 0.09	
Женьшеневый улун (производитель № 4)	0.35 ± 0.05	
Женьшеневый улун (производитель № 5)	0.051 ± 0.008	
Корень солодки (производитель № 1)	28 ± 4	
Корень солодки (производитель № 2)	29 ± 4	
Содержание глицирризина в образцах, рассчитанное при повторной экстракции	В пересчете на исходную навеску, мг/г	В % от суммарного содержания глицирризина
Корень солодки (производитель № 1)	2.2 ± 0.3	7
Женьшеневый улун (производитель № 5)	0.010 ± 0.002	17

Таблица 3

Диагностические ионы паттернов фрагментации сапогенинов исследуемых групп сапонинов растительного происхождения

Table 3

Diagnostic ions from the sapogenin fragmentation patterns of investigated groups of plant saponins

Тип сапогенина	Растение	Диагностические ионы, m/z
Протопанаксатриол (PPT)	Женьшень	441, 423, 405
Протопанаксадиол (PPD)	Женьшень	443, 425, 407
Олеаноловая кислота (OA)	Женьшень	439, 393
Абрусогенин (A)	Абрус молитвенный*	485, 467, 449, 431, 439, 421, 403
Глицирретовая кислота (LSA)	Солодка	471, 453, 435,
24-гидроксиглицирретовая кислота (LSG)	Солодка	487, 469, 451
24-гидрокси-11-дезоксо-глицирретовая кислота (LSJ)	Солодка	473, 455, 437
24-гидроксиглабриолит (LSL)	Солодка	503, 485, 467

Примечание: * – четочник молитвенный (*Abrus precatorius*).

термической обработки исходного материала в процессе производства чая, поэтому на первой стадии экстракции из измельченных чайных гранул извлекается около 80 % глицирризина (табл. 2). Содержание глицирризина сильно отличается в чаях разных производителей, а на хроматограмме экстракта из оригинального китайского женьшеневого улуна (Huanglongtai tea co., ltd., КНР) пик глицирризина отсутствовал даже на уровне предела обнаружения.

Хроматографический пик по сигналу ионного перехода с $m/z = 821 \rightarrow 193$ был зарегистрирован с близким к пику глицирризина временем удерживания (8.8 мин) в экстракте из листьев *A. precatorius* и соответствовал абрусозиду D, молекула которого включает только один остаток глюкуроновой кислоты. Таким образом, в проведенном эксперименте показано, что метод ВЭЖХ-МС/МС, с применением двух ионных переходов, позволяет успешно идентифицировать и определять глицирризин, а рекомендация авторов работы [23] – использовать характеристичный фрагментный ион с $m/z = 351$ для быстрой идентификации сапонинов корня солодки может быть применена к препаратам и продуктам, одновременно содержащим экстракт корня солодки и женьшеня, а также листьев *A. precatorius*. Однако, учитывая многообразие используемых в ТКМ растений, нельзя гарантировать, что другие компоненты, содержащие цепочку из двух сахаридных остатков глюкуроновой кислоты, не будут мешать такому определению глицирризина и его аналогов в комплексных препаратах.

Разработка нового способа групповой идентификации сапонинов. Для того чтобы охарактеризовать образец препарата ТКМ, чаще всего применяют подход с использованием «отпечатков пальцев» по присутствию, соотношению и составу нескольких характеристичных компонентов – биомаркеров растений. Существующие способы основаны на определении нескольких биомаркеров, стандарты которых коммерчески доступны, а условия детектирования индивидуальны (регистрация

выбранных ионных переходов или молекулярных ионов по точному значению m/z). Для повышения достоверности при такой идентификации компонентов в пищевых добавках и лекарственных средствах возможно использование более информативных способов анализа, таких как ВЭЖХ-МС в режиме сканирования, например, с использованием линейной ионной ловушки (ЛИЛ) и в режиме регистрации диагностических ионов, которые встречаются в масс-спектрах целой группы близких по структуре компонентов того или иного растения. Недостатком первого способа является необходимость в трудоемкой ручной обработке данных, поскольку сведение таких спектров в единую базу или библиотеку масс-спектров невозможно из-за индивидуальных особенностей источников ионизации разных производителей, их состояния, состава применяемых подвижных фаз и т.д. Кроме того, полное хроматографическое разделение недостижимо даже при анализе экстракта из одного растения, а тем более при анализе экстракта из смешанного препарата, это приводит к наложению масс-спектров компонентов с близкими временами удерживания, что сильно осложняет интерпретацию.

Второй способ, хотя и проигрывает по информативности, поскольку регистрация всех сигналов в масс-спектрах фрагментных ионов не осуществляется, обладает рядом преимуществ. Во-первых, в некоторых случаях, например, для группы родственных сапонинов можно выделить целый набор диагностических ионов из паттерна фрагментации сапогенина [30], это позволяет отличить эту группу от других гликозидов даже при совпадении их брутто-формулы, что повышает информативность и достоверность такого подхода. Во-вторых, на хроматограммах, полученных по сигналам диагностических ионов, можно выделить все пики исследуемой группы соединений, что также ведет к увеличению информативности и возможности к автоматизации данного подхода.

Для того чтобы сопоставить сапониновые профили исследуемых экстрактов, были получены хроматограммы при одновременной регистрации сигналов из паттернов фрагментации нескольких сапонинов (табл. 3). Использование длительных программ градиентного элюирования позволяет для идентификации компонентов применять как

время удерживания основных пиков, так и присутствие всех характеристичных сигналов для каждой группы сапонинов. Графически применение данного подхода можно показать, построив хроматограммы по сумме сигналов каждого паттерна фрагментации (рис. 2). Так было продемонстрировано присутствие абрусозидов из листьев *A. precatorius*, а так-

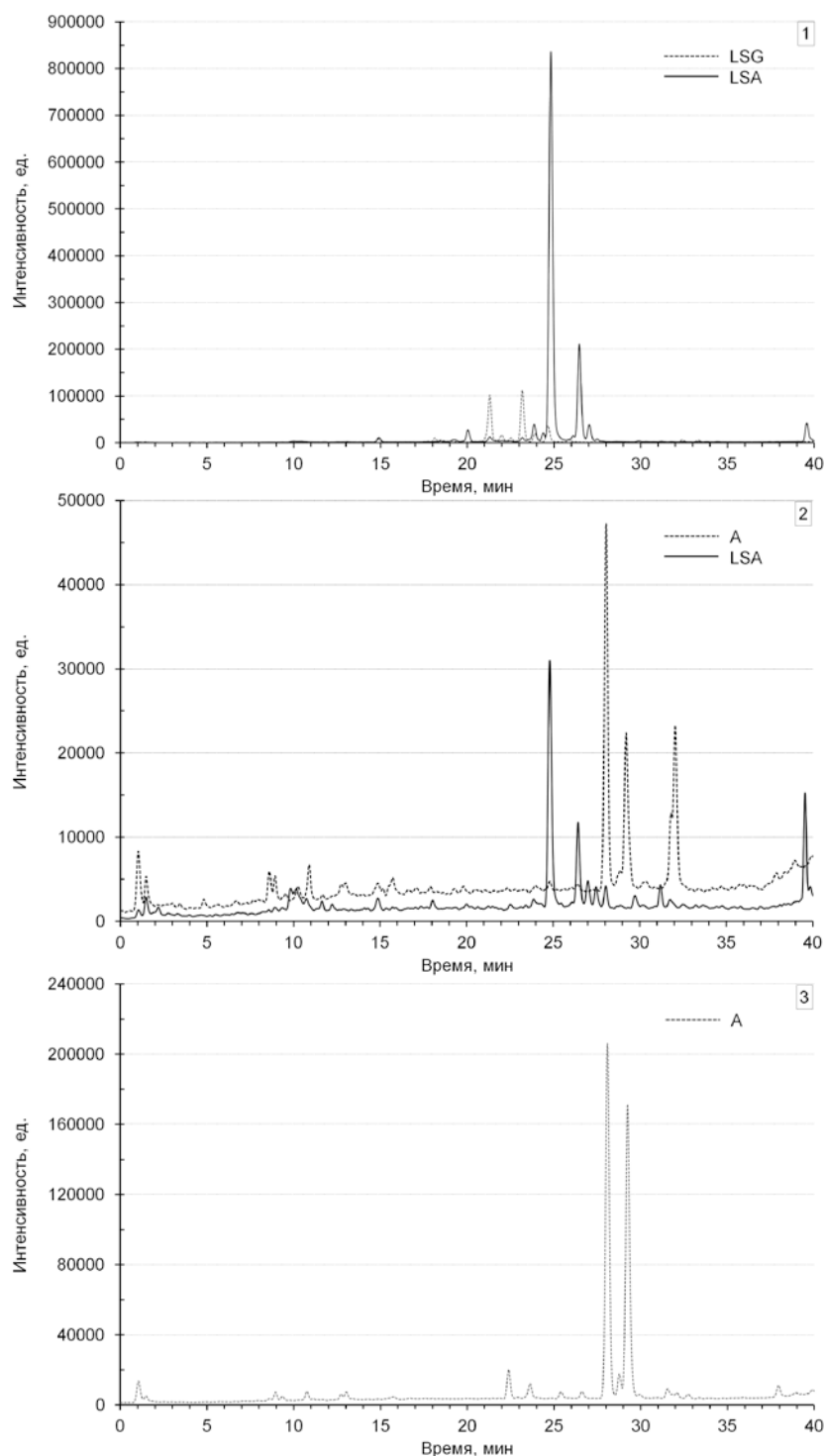


Рис. 2. Хроматограммы экстракта из сухого корня солодки – 1, экстракта из женьшеневого улуна (производитель № 3) – 2 и листьев абруса молитвенного – 3, полученные при суммировании сигналов, характерных для абрусозидов (A) и производных глицирретовой кислоты (LSA) и 24-гидроксиглицирретовой кислоты (LSG)

Fig. 2. Chromatograms of dry licorice root extract – 1, ginseng oolong (manufacturer № 3) extract – 2 and *Abrus precatorius* leaves extract – 3, recorded by the sums of the signals, specific for abrusosides (A), glycyrrhetic acid (LSA) and 24-hydroxyglycyrrhetic acid (LSG) derivatives

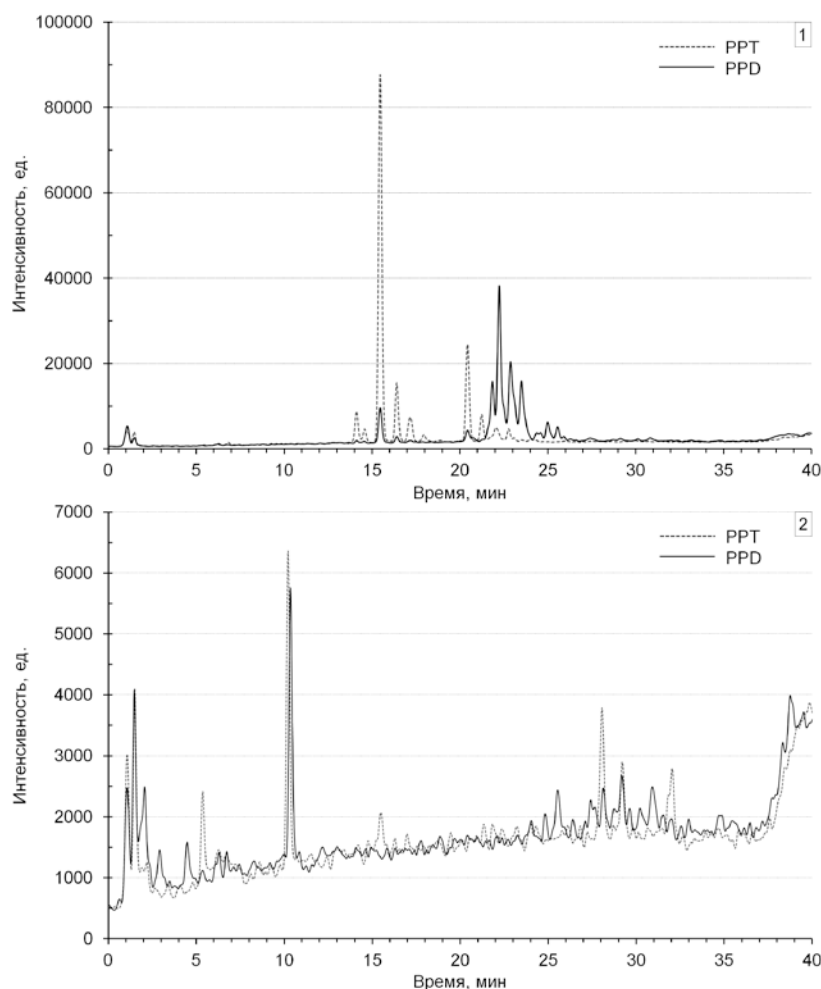


Рис. 3. Хроматограммы экстракта из сухого корня азиатского женьшеня – 1 и экстракта из женьшеневого улуна (производитель № 3) – 2, полученные при суммировании сигналов, характерных для гинсенозидов женьшеня протопанаксатриольного (PPT) и протопанаксадиольного типа (PPD)

Fig. 3. Chromatograms of dry *Panax ginseng* root extract – 1 ginseng oolong (manufacturer №3) extract – 2, recorded by the sums of the signals, specific for protopanaxatriol (PPT) and protopanaxadiol ginsenosides

же компонентов экстракта корня солодки в составе женьшеневого улуна, что обуславливает сладкий привкус этого вида чая. Оригинальные гинсенозиды женьшеня не были обнаружены в этом продукте, что также можно проиллюстрировать, сравнив хроматографические профили, полученные в режиме регистрации сигналов, характерных для протопанаксатриольных (PPT) и протопанксадиольных (PPD) гинсенозидов (рис. 3). Хроматографические пики с установленными временами удерживания практически отсутствовали на хроматограммах экстрактов из отдельных растений, построенных по сигналам паттерна фрагментации нехарактерной для них группы сапонинов. Например, на хроматограмме экстракта из корня женьшеня, построенной по сигналам диагностических ионов абрусозидов листьев четочника молитвенного, присутствовал только пик гинсенозида Ro (22.8 минут) из-за наличия иона с $m/z = 439$ в паттерне фрагментации его сапогенина – олеаноловой кислоты, в то время как времена удерживания пиков абрусозидов больше 25 минут в тех же условиях хроматографирова-

ния, а их паттерны фрагментации также содержат другие характеристичные сигналы (табл. 3). Таким образом, предложенный способ позволяет, на основании сопоставления профилей тритерпеновых сапонинов, идентифицировать присутствие в составе пищевых добавок и продуктов экстрактов из корней солодки, женьшеня или листьев четочника молитвенного, которые могут отвечать за наличие сладкого вкуса или аромата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана применимость ВЭЖХ-МС/МС определения глицирризина в экстрактах из растительного сырья и продуктах на его основе в присутствии близких по структуре тритерпеновых сапонинов других растений. Предел обнаружения при определении глицирризина составил 3 нг/мл и хорошая линейность наблюдалась в диапазоне концентраций от 10 до 1000 нг/мл. Показано, что экстракция раствором 70 %-ого водного изопропанола в ультразвуковой ванне в течение 40 мин позволяет извлечь около 80 % глицирризина, содержащегося в

чайных гранулах женьшеневого улуна, и около 90 % глицирризины из корня солодки. Также предложен способ получения сапониновых профилей по сигналам диагностических ионов нескольких групп компонентов растений, обладающих сладким вкусом и ароматом и применяемых для производства пищевых продуктов, биологически активных добавок и лекарственных средств. Показано присутствие в составе ароматизированного женьшеневого чая (улуна) тритерпеновых сапонинов корня солодки и листьев четочника молитвенного (*A. precatorius*).

Благодарности

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ) (№ гранта: мол_а_дк 16-33-60007).

Acknowledgements

This work was funded by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), according to the research project No. 16-33-60007 mol_a_dk.

ЛИТЕРАТУРА

- Wang Y.C., Yang Y.S. Simultaneous quantification of flavonoids and triterpenoids in licorice using HPLC // J. Chromatogr. B. 2007. V. 850, № 1-2. P. 392-399.
- Kao T.-C., Wu C.-H., Yen G.-C. A review of the bioactivity and potential health benefits of licorice // Agric. Food Chem. 2014. V. 62, № 3. P. 542-553.
- Dhingra D., Parle M., Kulkarni S.K. Memory enhancing activity of *Glycyrrhiza glabra* in mice // J. Ethnopharmacol. 2004. V. 91, № 2-3. P. 361-365.
- Changes in Components, Glycyrrhizin and Glycyrrhetic Acid, in Raw *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, Modify Insulin Sensitizing and Insulinotropic Actions / B.S. Ko et al. // Biosci. Biotech. Biochem. 2007. V. 71, № 6. P. 1452-1461.
- The Extract of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch Induces Apoptosis in MGC-803 Cells and its Molecular Mechanisms / J. Ma et al. // Biomed. Res. 2000. V. 21, № 3. P. 129-137.
- Kinghorn A.D., Soejarto D.D. Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants // Pure Appl. Chem. 2002. V. 74, № 7. P. 1169-1179.
- Tanaka O. Improvement of taste of natural sweeteners // Pure Appl. Chem. 1997. V. 69, № 4. P. 675-683.
- Finney R.S.H., Somer G.F. The antiinflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives // J. Pharm. Pharmacol. 1958. V. 10, № 1. P. 613-620.
- Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles / R. Pompei et al. // Nature, 1979. V. 281, № 5733. P. 689-690.
- Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells / E.H. Jo et al. // Cancer Lett. 2005. V. 230, № 2. P. 239-247.
- Zhang Q., Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216, № 11. P. 1954-1969.
- Liquorice-induced hypertension—a new understanding of an old disease: case report and brief review / J. Heikens et al. // Neth. J. Med. 1995. V. 47, № 5. P. 230-234.
- Licorice abuse: time to send a warning message / H.R. Omar et al. // Ther. Adv. Endocrinol. Metab. 2012. V. 3, № 4. P. 125-138.
- Murphy S., Agger S., Rainey P. Too much of a good thing: a woman with hypertension and hypokalemia // Clin. Chem. 2009. V. 55, № 12. P. 2093-2096.
- Sun C., Xie Y.C., Liu H.Z. Microwave-assisted Micellar Extraction and Determination of Glycyrrhizic Acid and Liquiritin in Licorice Root by HPLC // Chin. J. Chem. Eng. 2007. V. 15, № 4. P. 474-477.
- Ong E.S., Chemical assay of glycyrrhizin in medicinal plants by pressurized liquid extraction (PLE) with capillary zone electrophoresis (CZE) // J. Sep. Sci. 2002. V. 25. P. 825-831.
- Ong E.S., Len S.M. Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein and glycyrrhizin in medicinal plants // Anal. Chim. Acta. 2003. V. 482, № 1. P. 81-89.
- Effects of modifiers on the supercritical CO₂ extraction of glycyrrhizin from licorice and the morphology of licorice tissue after extraction / H.S. Kim et al. // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2004. V. 9, № 6. P. 447-453.
- Shabkhiz M.A., Eikani M.H., Sadr Z.B., Golmohammad F. Superheated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root // Food Chem. 2016. V. 210. P. 396-401.
- Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS / P. Montoro et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2011. V. 54, № 3. P. 535-544.
- Simultaneous determination of triterpenoid saponins in dog plasma by a validated UPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after administration of total saponin of licorice / W. Tao et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2013. V. 75. P. 248-255.
- Liu Y., Yang J.S., Cai Z.W. Chemical investigation on Sijunzi decoction and its two major herbs Panax ginseng and *Glycyrrhiza uralensis* by LC/MS/MS // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. V. 41, № 5. P. 1642-1647.
- Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of PHY906, a Chinese medicine formulation for cancer therapy / M. Ye et al. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007. V. 21, № 22. P. 3593-3607.
- Qualitative and quantitative analysis of traditional Chinese medicine *Niu Huang Jie Du Pill* using ultra performance liquid chromatography coupled with tunable UV detector and rapid resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry / X. Liang et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2010. V. 51, № 3. P. 565-571.
- Simultaneous determination and assignment of 13 major flavonoids and glycyrrhizic acid in licorices by HPLC-DAD and Orbitrap mass spectrometry analyses / S.-S. Wei et al. // Chin. J. Nat. Med. 2015. V. 13, № 3. P. 232-240.
- Belu A.M., Graham D.J., Castner D.G. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces // Biomaterials. 2003. V. 24, № 21. P. 3635-3653.
- Barker J. Mass Spectrometry: Analytical Chemistry by Open Learning, 2nd Edition D.J. Ando (Editor). Chichester: Wiley, 1999. 532 p.
- Kennelly E.J., Cai L., Kim N.C., Kinghorn A.D. Abrusoside E, a further sweet-tasting cycloartane glycoside from the leaves of *Abrus precatorius* // Phytochemistry. 1996. V. 41, № 5. P. 1381-1383.
- European Pharmacopoeia, 2nd ed., Council of Europe, Strasbourg, 1995.

30. Single-run HPLC/ESI-LITMS profiling of ginsenosides in plant extracts and ginseng based products / A. Stavrianidi et al.] // *Biomed. Chrom.* 2015. V. 29. № 6. P. 853-859.

REFERENCES

- Wang Y.C., Yang Y.S. Simultaneous quantification of flavonoids and triterpenoids in licorice using HPLC. *Journal of Chromatography B*, 2007, vol. 850, no. 1-2, pp. 392-399. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.12.032
- Kao T.-C., Wu C.-H., Yen G.-C. A review of the bioactivity and potential health benefits of licorice. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2014, vol. 62, no. 3, pp. 542-553. DOI: 10.1021/jf404939f
- Dhingra D., Parle M., Kulkarni S.K., Memory enhancing activity of *Glycyrrhiza glabra* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, vol. 91, no. 2-3, pp. 361-365. DOI: 10.1016/j.jep.2004.01.016
- Ko B.S., Jang J.S., Hong S.M., Sung S.R., Lee J.E., Lee M.Y., Jeon W.K., Park S. Changes in Components, Glycyrrhizin and Glycyrrhetic Acid, in Raw *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, Modify Insulin Sensitizing and Insulinotropic Actions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, vol. 71, no. 6, pp. 1452-1461. DOI: 10.1271/bbb.60533
- Ma J., Peng W.L., Liang D., Fu N.Y., Pang D.B., Xu A.L. The Extract of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch Induces Apoptosis in MGC-803 Cells and its Molecular Mechanisms. *Biomedical Research*, 2000, vol. 21, no. 3, pp. 129-137. DOI: 10.2220/biomedres.21.129
- Kinghorn A.D., Soejarto D.D. Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. *Pure and Applied Chemistry*, 2002, vol. 74, no. 7, pp. 1169-1179. DOI: 10.1351/pac200274071169
- Tanaka O. Improvement of taste of natural sweeteners. *Pure and Applied Chemistry*, 1997, vol. 69, no. 4, pp. 675-683. DOI: 10.1351/pac199769040675
- Finney R.S.H., Somer G.F. The antiinflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1958, vol. 10, no. 1, pp. 613-620. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1958.tb10349.x
- Pompei R., Flore O., Marcialis M.A., Pani A., Loddo B. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature*, 1979, vol. 281, no. 5733, pp. 689-690. DOI: 10.1038/281689a0
- Jo E.H., Kim S.H., Ra J.C., Kim S.R., Cho S.D., Jung J.W., Yang S.R., Park J.S., Hwang J.W., Aruoma O.I., Kim T.Y., Lee Y.S., Kang K.S. Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Letters*, 2005, vol. 230, no. 2, pp. 239-247. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.12.038
- Zhang Q., Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, no. 11, pp. 1954-1969. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.07.072
- Heikens J., Fliers E., Endert E., Ackermans M., Montfrans G.V. Licorice-induced hypertension—a new understanding of an old disease: case report and brief review. *The Netherlands Journal of Medicine*, 1995, vol. 47, no. 5, pp. 230-234. DOI: 10.1016/0300-2977(95)00015-5
- Omar H.R., Komarova I., El-Ghonemi M., Fathy A., Rashad R., Abdelmalak H.D., Yerramada M.R., Ali Y., Helal E., Camporesi E.M. Licorice abuse: time to send a warning message. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 2012, vol. 3, no. 4, pp. 125-138. DOI: 10.1177/2042018812454322
- Murphy S., Agger S., Rainey P. Too much of a good thing: a woman with hypertension and hypokalemia. *Clinical Chemistry*, 2009, vol. 55, no. 12, pp. 2093-2096. DOI: 10.1373/clinchem.2009.127506
- Sun C., Xie Y.C., Liu H.Z. Microwave-assisted Micellar Extraction and Determination of Glycyrrhizic Acid and Liquiritin in Licorice Root by HPLC. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2007, vol. 15, no. 4, pp. 474-477. DOI: 10.1016/S1004-9541(07)60111-6
- Ong E.S., Chemical assay of glycyrrhizin in medicinal plants by pressurized liquid extraction (PLE) with capillary zone electrophoresis (CZE). *Journal of Separation Science*, 2002, vol. 25, pp. 825-831. DOI: 10.1002/1615-9314(20020901)25:13<825::AID-JSSC825>3.0.CO;2-I
- Ong E.S., Len S.M. Pressurized hot water extraction of berberine, baicalin and glycyrrhizin in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*, 2003, vol. 482, no. 1, pp. 81-89. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00196-X
- Kim H.S., Lee S.Y., Kim B.Y., Lee E.K., Ryu J.H., Lim G.B. Effects of modifiers on the supercritical CO₂ extraction of glycyrrhizin from licorice and the morphology of licorice tissue after extraction. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, vol. 9, no. 6, pp. 447-453. DOI: 10.1007/BF02933484
- Shabkhiz M.A., Eikani M.H., Sadr Z.B., Golmohammad F. Superheated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Food Chemistry*, 2016, vol. 210, pp. 396-401. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.006
- Montoro P., Maldini M., Russo M., Postorino S., Piacente S., Pizza C. Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, vol. 54, no. 3, pp. 535-544. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.10.004
- Tao W., Duan J., Guo J., Li J., Tang Y., Liu P., Yang N. Simultaneous determination of triterpenoid saponins in dog plasma by a validated UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after administration of total saponin of licorice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, vol. 75, pp. 248-255. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.11.035
- Liu Y., Yang J.S., Cai Z.W. Chemical investigation on Sijunzi decoction and its two major herbs Panax ginseng and *Glycyrrhiza uralensis* by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41, no. 5, pp. 1642-1647. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.02.033
- Ye M., Liu S.H., Jiang Z.L., Lee Y.S., Tilton R., Cheng Y.C. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of PHY906, a Chinese medicine formulation for cancer therapy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, vol. 21, no. 22, pp. 3593-3607. DOI: 10.1002/rcm.2832
- Liang X., Zhang L., Zhang X., Dai W., Li H., Hu L., Liu H., Su J., Zhang W. Qualitative and quantitative analysis of traditional Chinese medicine Niu Huang Jie Du Pill using ultra performance liquid chromatography coupled with tunable UV detector and rapid resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, vol. 51, no. 3, pp. 565-571. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.09.015
- Wei S.-S., Yang M., Chen X., Wang Q.-R., Cui Y.-J. Simultaneous determination and assignment of 13 major flavonoids and glycyrrhizic acid in licorices by HPLC-DAD and Orbitrap mass spectrometry analyses. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015, vol. 13, no. 3, pp. 232-240. DOI: 10.1155/2013/786151
- Belu A.M., Graham D.J., Castner D.G. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces. *Biomaterials*,

2003, vol. 24, no. 21, pp. 3635-3653. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00159-5

27. Barker J. Ando D.J., eds. Mass Spectrometry: Analytical Chemistry by Open Learning. Chichester, Wiley, 1999. 532 p. ISBN: 978-0-471-96762-0

28. Kennelly E.J., Cai L., Kim N.C., Kinghorn A.D. Abrusoside e, a further sweet-tasting cycloartane glycoside from the leaves of *Abrus precatorius*. *Phytochemistry*, 1996, vol. 41, no. 5, pp. 1381-1383. DOI: 10.1016/0031-9422(95)00792-X

29. European Pharmacopoeia, 2nd ed., Council of Europe, Strasbourg, 1995.

30. Stavrianidi A., Rodin I., Braun A., Stekolshchikova E., Shpigun O. Single-run HPLC/ESI-LITMS profiling of ginsenosides in plant extracts and ginseng based products, *Biomedical Chromatography*, 2015, vol. 29, no. 6, pp. 853-859. DOI: 10.1002/bmc.3364